

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-335965
(43)Date of publication of application : 26.11.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 35/76
A61K 48/00
A61P 35/00
C12N 5/10

(21)Application number : 2001-143999

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 14.05.2001

(72)Inventor : TAKAHASHI KATSUTO
YAMAMURA TOMOKO
MIYATAKE SHINICHI

(54) CELL-SPECIFIC EXPRESSION REPLICATION VECTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To construct a vector specifically expressing and replicating a gene in a specific cell, to provide a DNA with gene expression control activity for use in constructing the vector, and to provide e.g. a method for treating a malignant tumor, or the like, by transferring the vector into a specific biological tissue or cell with the region and by expressing and replicating the gene.

SOLUTION: This method for treating a malignant tumor comprises the steps of obtaining the transcription initiation control region of human calponin gene which is specifically expressed in a cell, linking the region to the upstream portion of a replication-related gene for a virus, integrating the resultant into a viral DNA to construct the objective cell-specific expression replication vector inert to a normal cell in an adult, transferring the vector into a malignant tumor cell, and thus selectively damaging the oncocyte or the proliferated smooth muscle cell of a neoplastic blood vessel.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-335965

(P2002-335965A)

(43)公開日 平成14年11月26日 (2002.11.26)

(51)IntCL'
C 12 N 15/09
A 61 K 35/76
48/00
A 61 P 35/00
C 12 N 5/10

識別記号
ZNA

F I
A 61 K 35/76
48/00
A 61 P 35/00
C 12 N 15/00
5/00

テ-7J-ド(参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 6 5
4 C 0 8 4
Z N A A 4 C 0 8 7
B

審査請求 未請求 請求項の数30 OL (全 23 頁)

(21)出願番号 特願2001-143999(P2001-143999)

(22)出願日 平成13年5月14日 (2001.5.14)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年5月9日 A
CAADEMIC PRESS (A Harcourt
Science and Technology Co
mpany) 発行の「MOLECULAR THERA
PY Volume 3, Number 5」に発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 高橋 克仁

大阪府池田市菅原町3-1-1004

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞特異的発現複製ベクター

(57)【要約】

【課題】 特定の細胞に特異的に遺伝子を発現し複製するベクターを構築すること、及びその構築のために利用する遺伝子発現制御活性を有するDNAを提供すること、更には、該ベクターを悪性腫瘍等の特定の生体組織または細胞に導入し、該ベクターが遺伝子を発現し複製することによって治療する方法などを提供すること。

【解決手段】 細胞に特異的に発現するヒトカルボニン遺伝子の転写開始制御領域を取得し、これをウイルスの複製関連遺伝子の上流に連結し、それをウイルスDNAに組み込んで成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築し、この構築した細胞特異的発現複製ベクターを悪性腫瘍細胞に導入し、腫瘍細胞または腫瘍新生血管の増殖平滑筋細胞を選択的に傷害する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を、所定の遺伝子の上流に組み込んだことを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項2】 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号1に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項1記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項3】 配列番号1に示される塩基配列を含む領域が、配列番号2に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項2記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項4】 配列番号2に示される塩基配列を含む領域が、配列番号3に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項3記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項5】 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項1記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項6】 転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項7】 エンハンサーが4F2エンハンサーであることを特徴する請求項6記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項8】 所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴する請求項1～7記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項9】 ウィルス複製関連遺伝子が、ウィルスの複製開始に必須な転写因子をコードする遺伝子（ICP4）であることを特徴する請求項8記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項10】 所定の遺伝子のさらに下流に、アボトーシス関連遺伝子が連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項11】 所定の遺伝子のさらに下流に、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項12】 所定の遺伝子のさらに下流に、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項13】 所定の遺伝子のさらに下流に、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項14】 発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項1～13のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項15】 ウィルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（HSVベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項14記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項16】 肿瘍細胞特異的及び腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項1～15のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項17】 リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）をコードするDNA及び/又はチミジンキナーゼ（Thymidine kinase）をコードするDNAを欠失していることを特徴とする請求項1～16のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

【請求項18】 配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項19】 配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項20】 配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項21】 配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、又はそれらの相補的配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項22】 配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3に示される塩基配列、又は、配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列の上流にエンハンサー配列を組み込んだ配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA。

【請求項23】 エンハンサーが4F2エンハンサーであることを特徴する請求項2記載のDNA。

【請求項24】 請求項1～17に記載の成体正常細胞

に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法。

【請求項25】 生体細胞組織が、腫瘍組織であることとする請求項24に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法。

【請求項26】 請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬。

【請求項27】 悪性腫瘍に対する治療薬であることを特徴とする請求項26記載の治療薬。

【請求項28】 請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させることを特徴とする悪性腫瘍の治療方法。

【請求項29】 請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、腫瘍細胞だけを選択的に破壊することを特徴とする悪性腫瘍の治療方法。

【請求項30】 請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、腫瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊することを特徴とする悪性腫瘍の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、特定の細胞に特異的に遺伝子を発現させ自己複製する成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター及び該ベクター構築のために利用できる遺伝子発現制御活性を有するDNA、更には前記ベクターを用いて、特定の生体細胞で遺伝子を発現する方法、あるいは特定の細胞を破壊する方法等に関する。特に、腫瘍の遺伝子治療等の分野において、腫瘍細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの構築、すなわち、正常細胞には傷害を与えることなく治療が可能となるような細胞への遺伝子導入及び細胞破壊ベクターの構築に関する。

【0002】

【従来の技術】 正常細胞には影響を与えず、癌細胞のみを選択的に傷害することができる、副作用の少ない理想的な癌の治療法が近年求められている。その一つとして遺伝子治療法が挙げられるが、かかる治療法は癌細胞に導入する遺伝子の細胞選択性や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入法など、いろいろなレベルで癌細胞選択性を高めることができ、将来の

有望な治療法として注目されている。しかし、すべての癌細胞において治療遺伝子を導入できないという共通の問題がある。一方、癌の免疫細胞療法も、正常組織にもわずかながら組織特異的分化抗原の発現が認められるところから、正常細胞に対する副作用が問題となっている。また、突然変異に基づく癌抗原は、個々の癌にその変異が限られるという欠点をもっていることから、それを分子標的とした癌の免疫細胞療法として一般化するには適しているとはいえない。

【0003】 最近、感染と複製によって次々と増殖細胞のみを選択的に傷害する複製可能型単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターを用いた悪性脳腫瘍の遺伝子治療臨床研究が米国と英国で行われている(Gene Ther. 7, 859-866, 2000, Gene Ther. 7, 867-874, 2000)。複製可能型HSVベクターは、ウイルス複製に必須なRibonucleotide reductase (RR)又はThymidine kinase (TK)を欠失したベクターであり、これらの酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、腫瘍細胞では構成的に発現している。そのため、このHSVベクターは、正常細胞であれ腫瘍細胞であれ増殖の盛んな細胞に感染すると、細胞由来のRRやTKを利用して複製され細胞溶解活性を示す。一方、国内では動物実験で、前立腺癌や膀胱癌に対する複製可能型HSVベクターの抗腫瘍効果が報告されている(J. Surg. Oncol. 72, 136-141, 1999)が、これらも細胞選択性がなく、安全性が低い。従って、血液脳関門があり、循環血液中にベクターが拡散しない脳ではヒトの治療に用いることができたが、脳以外の臓器での治療には適さないという問題点があった。

【0004】 上記のことから、HSVベクターの傷害活性を標的細胞特異的にコントロールできれば、さらに有効で安全な治療法になると考えられている。これまでに、本発明者の一人である宮武と米国のMartuzaらによって、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択性の複製可能型HSVベクターが報告されている(J. Virol. 71, 5124-5132, 1997)。しかし、かかるベクターを用いると肝細胞癌ではアルブミン遺伝子の発現が低下し、また正常な再生肝細胞をも傷害することなどからヒトでの臨床応用には適さないと考えられている。その他、Martuzaと本発明者の一人である宮武らによって1998年3月に取得されている米国特許5728379(「腫瘍あるいは細胞特異的単純ヘルペスウイルスの複製」)には、中皮腫に対する応用の可能性を述べているが、平滑筋肉腫や骨肉腫などのヒトの肉腫全般に対する応用可能性の記述はされていない。

【0005】 肉腫の病因と病態に関する遺伝子解析により、一部の腫瘍でp53とRbの変異や融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ広く治療に応用できる段階に至ってはいない。ヌードマウスを用いた動物実験で、M1asらは複製能を持たないアデノウイルスベクターを用いて平滑筋肉腫細胞にp53遺伝子を導入し、腫瘍の

増殖遅延効果があることを報告している (Cancer Gene Ther. 7, 422-429, 2000)。その他、オステオカルシン遺伝子のプロモーターを用いて、自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを骨肉腫に導入発現させる方法が報告されている (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998) が、これは複製能を欠失したウイルスベクターを用いたものであり、遺伝子導入の効率が悪く、骨肉腫以外の肉腫には適用できない。特に、Milasらの報告では、本発明の実施例に記載されているのと同じ、ヒト平滑筋細胞株SK-LMS-1を用いた実験例を示しているが、本発明で使用したウイルスベクターの粒子量の100～1000倍多くのウイルス粒子を使用し、効果は本発明の実施例よりも劣っている。従って、Milasらの結果は、体内に注入するウイルス粒子の数をできるだけ少なくして副作用を押さえるという観点から、好ましいとは言えない。

【0006】また、癌の血管新生抑制療法としては、米国のFolkmanのグループによるマウスの実験系で、アンジオスタチンやエンドスタチンなどのペプチド性抑制因子の劇的な抗腫瘍効果が報告されている (Cell 79, 315-328, 1994; Cell 88, 277-285, 1997)。我国においても中村らによって、肝細胞増殖因子の分子内断片であるNK₁の血管新生抑制作用が報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 846-852, 2000)。しかしこれらの方法は、大量のペプチドを必要とすること、エンドスタチンに関しては再現性が低いという報告があること、作用メカニズムが不明であること、さらにヒトでの有効性がまだ確認されていないこと、などの問題点がある。現在臨床試験中の血管新生阻害剤は、細胞選択性がなく、阻害効率も低い。米国のChereshらが報告した、内皮細胞の表面のインテグリンの作用を阻害するペプチドも同様に細胞選択性がなく、阻害効率が低い (J. Clin. Invest. 103, 1227-1230, 1999)。これらの研究は、すべて血管内皮細胞を標的にした治療であるが、腫瘍血管を構成する増殖血管平滑筋細胞を標的にした細胞選択性の治療剤は未だ知られていない。実際、平滑筋細胞の増殖と遊走を促進する血小板由来増殖因子受容体の拮抗剤が強力な腫瘍新生血管抑制作用をもつことが報告され (Cancer Res. 60, 4152-4160, 2000)、腫瘍血管新生を抑制するために血管平滑筋を攻撃することの重要性が推測されるが、この方法は細胞非選択性であり、副作用も予想される。

【0007】他方、本発明者らは、ヒト由来の肉腫の腫瘍細胞に平滑筋の分化マーカーとされるカルボニン遺伝子が発現していることを見い出し、はじめて報告した (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998; Sarcoma 3, 107-113, 1999; Intern. J. Cancer 82, 678-686, 1999)。その後、骨・軟部肉腫に加えて消化管ストローマ腫瘍 (GIST) や唾液腺肉腫、纖維肉腫、悪性神経鞘腫など20種類近い間葉系細胞由来のヒト悪性腫瘍で、カルボニン遺伝子が異常発現していることが国内外で相次い

で報告されている。上記カルボニン (h 1 又はbasic) は、X線結晶構造と、インピトロ及びインピボの機能解析により、アクチン分子のC末端に結合して、アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制することが明らかにされている (Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150-157, 2000; J. Physiol. 529, 811-824, 2000)。カルボニン遺伝子は、成体では、平滑筋細胞に選択的に発現し、血管の分化のマーカーと考えられている (Physiol. Rev. 75, 487-517, 1995)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷を与えないような、細胞特異的発現複製ベクターを構築すること、及びその構築のために利用する遺伝子発現制御活性を有するDNAを提供すること、更には、該ベクターを悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、特定の腫瘍細胞や平滑筋細胞に特異的に発現するヒトカルボニン遺伝子の該細胞内における転写開始制御領域を取得し、ウイルス複製関連遺伝子の複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子の上流に組み込んで、これをウイルスDNAの複製に必須の酵素であるTK遺伝子と置き換えることによって、悪性腫瘍細胞や腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞等の特定の細胞で該遺伝子を発現させ、ウイルス複製を誘導し得る成人正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築した。この構築した細胞特異的発現複製ベクターを悪性腫瘍組織に導入したところ、腫瘍細胞や腫瘍新生血管の増殖平滑筋を選択的に傷害することを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明は、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を、所定の遺伝子の上流に組み込んだことを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項1) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号1に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項1記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項2) や、配列番号1に示される塩基配列を含む領域が、配列番号2に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項2記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項3) や、配列番号2に示される塩基配列を含む領域が、配列番号3に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項3記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項4) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号1、配列番号

2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が消失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項1記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項5）や、転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項6）や、エンハンサーが4F2エンハンサーであることを特徴する請求項6記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項7）や、所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴する請求項1～7記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項8）や、ウイルス複製関連遺伝子が、ウイルスの複製開始に必須な転写因子をコードする遺伝子（ICP4）であることを特徴する請求項8記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項9）や、所定の遺伝子のさらに下流に、アボトーシス関連遺伝子が連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項10）や、所定の遺伝子のさらに下流に、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項11）や、所定の遺伝子のさらに下流に、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項12）や、所定の遺伝子のさらに下流に、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項13）や、発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項1～13のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項14）や、ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（HSVベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項14記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項15）や、腫瘍細胞特異的及び腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項1～15のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項16）や、リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）をコードするDNA及び／又はチ

ミシンキナーゼ（Thymidine kinase）をコードするDNAを消失していることを特徴とする請求項1～16のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項17）に関する。

【0011】また本発明は、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA（請求項18）や、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA（請求項19）や、配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA（請求項20）や、配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が消失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、又はそれらの相補的配列からなることを特徴とするDNA（請求項21）や、配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3に示される塩基配列、又は、配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が消失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列の上流にエンハンサー配列を組み込んだ配列又はその相補的配列からなることを特徴とするDNA（請求項22）や、エンハンサーが4F2エンハンサーであることを特徴する請求項22記載のDNA（請求項23）に関する。

【0012】さらに本発明は、請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法（請求項24）や、生体細胞組織が、腫瘍組織であることを特徴とする請求項24に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法（請求項25）や、請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬（請求項26）や、悪性腫瘍に対する治療薬であることを特徴とする請求項26記載の治療薬（請求項27）や、請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させることを特徴とする悪性腫瘍の治療方法（請求項28）や、請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、腫瘍細胞だけを選択的に破壊することを特徴とする悪性腫瘍の治療方法（請求項29）や、請求項1～17に記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、腫瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊することを特徴とする悪性腫瘍の

治療方法（請求項30）に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとしては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を、所定の遺伝子の上流に組み込んだベクターであれば特に制限されるものではないが、腫瘍細胞特異的及び腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的発現複製ベクターが好ましく、上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域としては、細胞特異的に発現している遺伝子のプロモーター領域や該プロモーターの一部の領域を挙げることができ、より具体的には、カルボニン遺伝子のプロモーターの-260から-219までの配列番号1に示される塩基配列を含む領域、好ましくは配列番号2に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーター、より好ましくは配列番号3に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターとその構造遺伝子の一部を含む領域を例示することができる。また、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、上記配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、例えばマウス、ラット及びブタ由来のカルボニンプロモーターのそれに相同な領域を含む領域を例示することができる。

【0014】上記の他、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、増殖平滑筋細胞を攻撃の標的にする場合は、SM22 α 遺伝子のプロモーター領域（ヒトSM22 α 遺伝子では-480から-26までの配列；GenBank accession# D84342-D84344マウスやラットあるいはその他の哺乳動物由来のSM22 α 遺伝子ではそれに相同な領域）、内皮細胞を標的にする場合は、F1k-1のプロモーター領域又はF1k-1遺伝子のプロモーター領域を用いることができる。これらの場合にも、一部構造遺伝子を含む領域を転写開始制御領域とすることもできる。

【0015】上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域の上流に、転写を著しく活性化するエンハンサーを連結することが好ましく、かかるエンハンサーとしてはアデノウイルス初期遺伝子のエンハンサー、モロニーマウス白血病ウイルス末端反復配列のエンハンサー、ヒストンH2A遺伝子エンハンサー、免疫グロブリンエンハンサー、インスリン遺伝子エンハンサー、c-fos遺伝子エンハンサー、T細胞抗原受容体遺伝子エンハンサー、筋型クレアチンキナーゼ遺伝子エンハンサー、ヒト4F2重鎖（ヘビーチェイン）転写エンハンサー等のエンハンサーであれば特に制限されないが、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、カルボニン遺伝子のプロモーターの-260から+73までの配列を含む領域の場合、アミノ酸トランスポーターの活

性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質である4F2ヘビーチェイン遺伝子のエンハンサーであるヒト4F2重鎖転写エンハンサー（配列番号4）等の4F2エンハンサーが転写効率を著しく高めうる点で好ましい。

【0016】本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられる所定の遺伝子としては、ウイルスの複製の開始又は維持に必要な遺伝子であれば特に制限されるものではなく、例えば、アデノウイルスのE1A遺伝子、ICP6（Ribonucleotide reductase）遺伝子などのウイルス複製関連遺伝子を挙げることができ、中でもヘルペスウイルスの複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子（ICP4）を好適に例示することができる。また、これら遺伝子としては、転写開始制御領域の下流に位置する本来の構造遺伝子の一部又は全部と上記所定の遺伝子がインフレームで結合したものでもよく、例えば、カルボニン蛋白質のN末端の一部とICP4蛋白質との融合タンパク質をコードするDNAを具体的に挙げができる。

【0017】本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとして、所定の遺伝子のさらに下流に、アポトーシス関連遺伝子や、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAなどが1又は2以上連結され、前記転写開始制御領域とエンハンサーの制御下に発現することができる細胞特異的発現複製ベクターを用いることができる。上記アポトーシス関連遺伝子としては、Bcl- α s、Bok/Mtd、Bcl-Gs/Bra、Bcl-GL、Bcl-Rambo、Hrk/DP5、Bik/Nbk/Bik、Bad、Bid、BimL、S、EL/BodL、M、S、Noxa/APR、Puma等のアポトーシス促進遺伝子を、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、アンジオスタチン、エンドスタチン、FLK1、FLT1、FLT4、Tie1、Tie2などのタンパク質をコードするDNAを、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害剤、ウシラクトフェリン（bLF）などのタンパク質をコードするDNAを、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、p21、p16、p15、p53等の細胞周期抑制物質や、p53、Rb、IRF-1、APC等の細胞増殖抑制物質をコードするDNAを、それぞれ具体的に例示することができるがこれらに限定されるものではない。

【0018】本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられるウイルスベクターの骨格としては、骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍（GIST）、悪性中皮腫、悪性

纖維性組織球腫、纖維肉腫、悪性筋膜腫、神経鞘腫等の腫瘍細胞又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋あるいは血管周細胞に感染又は遺伝子を導入し発現することができるベクターが好ましく、かかるベクターとしては、染色体、エピソーム、リボソーム及びウイルスに由来する発現ベクターを例示することができるが、SV40のようなバーボウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、単純ヘルペスウイルスベクター(HSVベクター)等のウイルスベクターが好ましく、中でも、HSVベクターとアデノウイルスベクター、特に条件付き複製可能型HSVベクター、又は条件付き複製可能型アデノウイルスベクターが、遺伝子発現の高効率性、増殖細胞特異的細胞傷害活性などの点で好ましい。上記条件付き複製可能型HSVベクターとして、例えば、リボヌクレオチドリダクターゼ(Ribonucleotidereductase)をコードするDNAやチミジンキナーゼ(Thymidine kinase)をコードするDNAやこれらと共に欠失しているベクターを用いることにより、本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを好適に作製することができる。

【0019】本発明の対象となるDNAとしては、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNAや、配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNAや、配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列例えば、マウス、ラット、ブタなどの哺乳動物由来のカルボニン遺伝子の相同配列、又はその相補的配列からなるDNAであれば特に制限されるものではないが、好ましくは、配列番号1に示される塩基配列や、配列番号2に示される塩基配列や、配列番号3に示される塩基配列や、配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列などの上流にエンハンサー配列を組み込んだ配列、あるいは、それらの相補的配列からなるDNAを挙げることができる。また、エンハンサー配列としては、前記公知のエンハンサー配列、好ましくは配列番号4に示される塩基配列から成るヒト4F2重鎖転写エンハンサー等の4F2エンハンサー配列を挙げることができる。

【0020】本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの発現複製方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織、好ましくは骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍(GIST)、悪性中皮腫、悪性纖維性組織球腫、纖維肉腫、悪性筋膜腫、神経鞘腫等の腫瘍が生じている組織、器官に直接導入又は腫瘍を養

う血管系から注入し発現複製させる方法、又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋を攻撃の標的とする場合は、悪性固形腫瘍の種類がいかなるものであれ、直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入し、発現複製させる方法であれば、特に制限されるものでない。また、本発明の治療薬としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを有効成分として含むものであればどのようなものでもよく、かかる治療薬としては生体細胞組織、好ましくは上記悪性腫瘍に対する治療薬であることが好ましい。

【0021】そしてまた、本発明の悪性腫瘍の治療方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腫瘍組織に導入し、所定の遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、腫瘍細胞だけを選択的に破壊する方法や、腫瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法が好ましい。悪性腫瘍が生じている組織に導入する方法としては、悪性腫瘍に上記細胞特異的発現複製ベクターを直接注入する方法又は腫瘍を灌流する血管系に注入する方法を好適に例示することができる。

【0022】

【実施例】以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例A【方法と材料】

A-1 (細胞、培養方法、抗体、及びウイルス)
 ヒト平滑筋肉腫細胞株SK-LMS-1 (HTB-88)、ヒト骨肉腫細胞株HOS (CRL-1543)、
 30 MNNG-HOS (CRL-1547)、及びベロ細胞 (CCL-81) は、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (American Type Culture Collection) から購入した。ヒト平滑筋肉腫細胞株SKN (RCB0513) 及びヒト骨肉腫細胞株OST (RCB0454) は、理研ジーンバンク (RIKEN GENE BANK) から購入した。ヒト滑膜肉腫及びデスマヨイド細胞株は、各腫瘍患者から切除した腫瘍サンプルから樹立した。滑膜肉腫の診断は文献 (Sarcoma 3, 107-113, 1999) に記載のようにSYT-SX融合遺伝子の発現を確認することにより行った。初期培養されたヒトメサンギウム細胞 (HMC : 弘前大学医学部の山部博士より供与; Nephro 1. Dial. Transplant. 12, 438-442, 1997) をヒト胎児の腎臓 (妊娠16又は18週) から調製し (University Hospital of LeidenのDr. M.R. Dahaによって樹立されたもの)、4~6回継代培養したものを以下の実施例に用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞株HUVEC (T200-05) は、東洋紡バイオケミカルから購入した。ICP4遺伝子を導入したベロ細胞、E5細胞は、N. DeLuca (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh) から供与されたものを用いた。SK-LMS

－1は1 mMのビルビン酸ナトリウムを添加したイーグルMEMで培養した。HOS、MNNG-HOS、OST、ペロ及びE 5細胞は、DMEMで培養した。SKN細胞は、F 12培地で培養した。滑膜肉腫細胞及びデスマトイド腫瘍細胞は、RPMI 1640培地で培養した。ヒトメサンギウム細胞は1 mg/mlのD-グルコースを添加したDMEMで培養した。全ての培地には、最終濃度で10%，15%（SKNの場合）又は20%（滑膜肉腫細胞及びデスマトイドの場合）の熱不活性化ウシ胎仔血清（Upstate Biotechnologies）、2 mMのL-グルタミン、100 unit/mLのベニシリン、及び100 μg/mLのストレプトマイシンがそれぞれ含まれている。H U V E Cは、製造者の指示に従った培地で培養した。また、上記全ての細胞は、加湿された5%のCO₂条件下で37°Cにて培養した。

【0023】マウスカルボニン（basic or h1）に特異的なポリクローナル抗体は、文献（Genes Cells 3, 685-695, 1998）に記載の方法と同様に調製した。HSV-1又はHSV-2のICP4タンパク質に対するモノクローナル抗体（clone No.1101）は、Goodwin Institute for Cancer Researchのものを用いた。イムノプロット分析は、文献（Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998）記載の方法と同様に行なった。化学ルミネッセンス（EC-L；Amersham Pharmacia Biotech社製）は、製造者のプロトコルに従って結合抗体を視覚化した。また、それぞれE 5細胞又はペロ細胞に低多度で感染させることにより生成した、HSVのICP4欠損変異体d120（J. Virol. 56, 558-570, 1985）及びHSVのICP6（ribonucleotide reductase）欠損変異体h r R3は、N. Deluca又はS. Weller博士（University of Connecticut Health Center, Farmington）からそれぞれ供与されたものを用いた。

【0024】A-2（RNAの調製とRT-PCR分析）

全RNAはIsogene RNA extraction kit（Nippon Gene社製）を用いて培養した細胞又は組織からそれぞれ抽出し、文献（Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998）記載の半定量的RT-PCR分析を行なった。PCR増幅の条件としては、94°Cで40秒間変性させ、60°Cで30秒間アニーリングし、72°Cで90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰り返し行なった。ヒトカルボニンプライマーとしては、5'-gactgtgtcagacggaaacctcagcc-3'【フォーワードプライマー1（FP1）；nt# 10-33 GenBank D17408；配列番号5】と5'-gtctgtgcccagcttggggtc-3'【リバースプライマー1（RP1）；nt# 660-680；配列番号6】を、コントロールとしてのGAPDH（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）のプライマーとしては、5'-cccatcaccatcttccaggaa-3'【フォーワードプライマー2（FP2）；nt# 342-360；配列番号7】と5'-ttgtcataccaggaaatgaa-3'【リバースプライ

イマー2（RP2）；nt# 1052-1070；配列番号8】を用いて、それぞれ671 bpと731 bpのDNAを増幅させた。

【0025】A-3（ヒトカルボニンプロモーターの単離）

文献（J. Biochem. 120, 18-21, 1996）記載の方法に従い、ヒトゲノム入EMBL 3ファージライブラリーのスクリーニングを行なって、ヒトカルボニン遺伝子の5'上流側を含むゲノムクローニングを単離した。5'側が欠失した断片であるp-1159Luc、p-385Luc、p-343Luc、p-310Luc、p-299Luc、p-288Luc、p-260Luc、p-239Luc、p-219Luc、p-201Luc、p-176Luc、p-153LucをPCR法で増幅することにより作製し、その後pGL2-Basicベクター（Promega）にサブクローニングした。番号は、以後+1と表示されるATG翻訳開始コドンの上流に位置するDNA断片の5'末端を示している。欠失したこれらの断片は+73の位置に共通の3'末端を有している。DQS-2000L DNA sequencer（SHIMADZU社製）を製造者のプロトコルに従って使用し、該クローニング断片のヌクレオチド配列を決定し、その配列は文献（J. Biochem. 120, 18-21, 1996）に記載の配列（DDBJ/GenBank™/EMBL database；accession No. D85611）と同一であることを確認した。

【0026】A-4（トランスフェクション及びルシフェラーゼ分析）

トランスフェクションする24時間前に、あらかじめ培養した細胞を分割し、プレート上に播いた。製造者のプロトコルに従い1ウエル当たり、1.2 μgのプロモーターブラスミドと、0.3 μgのpCAGGS/β-gal関連ブラスミドと、3.75 μlのFuGENE™ 6トランスフェクション試薬（Roche社製）とを6ウエルディッシュに注入し、細胞（5 × 10⁴）をトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後、100 μl/ウエルの細胞溶解緩衝液（PicaGene™ ルシフェラーゼ分析システム、Toyo Ink社製）中で細胞を回収した。4°Cで12000 g × 5分間の遠心分離を行なった後、上清（20 μl又は30 μl）をルシフェラーゼアッセイ及びβ-ガラクトシダーゼアッセイにそれぞれ使用した。ルシフェラーゼ活性はBLR-201 luminescence reader（Aloka社製）を用いて測定した。β-ガラクトシダーゼアッセイは、文献（J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997）記載の方法に準じてβ-ガラクトシダーゼ酵素分析システム（Promega社製）を用いて行なった。再現性を確認するため、全実験は最低三回繰り返した。細胞抽出物のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することによりトランスフェクション効率を決定し、その値に応じて、ルシフェラーゼ活性（光ユニット）を補正した。SV40エンハンサー及びSV40プロモーターを含むpSV2-Luc遺伝子の発現を比較することにより、種

々の細胞株のトランスフェクション効率を評価した。データは、pSV2-Lucの値に対してノーマライズした吸光度±S.E.を%として表している。

【0027】A-5 (ウィルスの調製)

ICP4のコード領域を含むpGH108 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 由来の4.1kbの平滑末端SalI-MseI断片 (Johns Hopkins School of MedicineのHayward博士より提供) を、pAMP1ベクターにクローニングした333bpヒトカルボニンプロモーター (-260~+73) の下流の平滑末端 HindIII サイトに挿入し、及びかかるベクターのSmaIサイトにヒト4F2重鎖転写エンハンサー (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989) (Harvard Medical SchoolのLeiden氏より提供) の444bpのNotI断片をサブクローンした。このpAMP1/CALP-ICP4ベクターを、SalIとHindIIIとを用いて二重消化することにより得られた4.7kb断片を、pTKΔL組換えベクターのXbaI平滑末端サイトにサブクローンした。pTKΔL組換えベクターは、0.5kbのBgIII-KpnI領域が欠失したTKコード配列、大腸菌 (Escherichia coli) 由来のlacZ、及びTK配列の上流 (TKの+53) (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997)、SV40由来ポリAシグナルから構成されている。製造者のプロトコルに従ってLipofectamine® (GIBCO/BRL社製) を使用し、上記プラスミドをSalIサイトで線状化したpTKΔ-CALP-ICP4とd120DNAとを、E5細胞にコトランスフェクションした。単一のブラークとして同定した組換えウィルスベクターd12.CALPを、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-gal) アガロースオーバーレイで青色に染色し、ガムシクロビア (1μ/m1) の存在下でE5細胞に感染させるというブラーク精製を三回行った。DNAを精製した後、制限酵素で分解し、ザザンプロット、及びPCR分析によりその組換えを確認した。

【0028】10~20個の150cm²/tissue culture flasks (IWAKI CLASS社製) 中のE5細胞に感染させ、48時間後に剥離した細胞を回収することにより、ウィルスを調製した。4°Cで5分間、400×gで遠心分離を行って細胞を収集し、10mlのコールドウィルスバッファー (150mMのNaClを含む20mMのTris-HCl: pH 7.5) に懸濁した。超音波処理 (1分間を6回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を三回行い、上記細胞を溶解した。4°Cで5分間、1500×gで遠心分離を行ったあと、その上清に対してさらに4°Cで45分間、15000×gで遠心分離を行った。その結果得られたペレットをコールドウィルスバッファーに懸濁し、E5細胞におけるブラークアッセイにより精製したd12.CALPの力値を決定した。

【0029】A-6 (インビトロでの細胞崩壊分析及び

ウィルス複製分析)

1%の熱不活性FBS/PBS中で、感染多度 (MOI) が0.01~0.001pfu/cellで、6ウェル組織培養プレート中の細胞のサブコンフルエント単層にウィルスを感染させた。かかる感染細胞を37°Cで1時間インキュベートし、その後、1%のFBSと11.3μg/mlのヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Lab.社製) を含む前記培地で培養した。感染の48時間後、ブラーク/ウェルの数を計測した。ウィルス複製分析のために、12ウェル組織培養プレート中のSK-LMS-1細胞又はOST細胞の単層培養 (2×10³細胞/well) に、1%のFBS/PBS中で、感染多度 (MOI) が0.1となるようにd12.CALPを感染させた。接種したウィルスを1時間後に取り除き、上記細胞を前記培地でインキュベートした。所定の時間 (12時間、24時間、48時間) に、100μlのウィルスバッファーを用いて感染細胞をウェルから剥がした。細胞溶解物 (1μl) を10⁻¹、10⁻²及び10⁻³に希釈し、その後E5細胞におけるウィルスの力値を決定した。

【0030】ICP4発現のイムノプロット分析のため、SK-LMS-1細胞及びOST細胞に、感染多度 (MOI) が0.01となるようにd12.CALP又はウィルスバッファーのみをそれぞれ感染させ、22時間培養したのち回収した。同量のタンパク質を9%のSDS-PAGEゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad社製) に移した。5%のスキムミルク (DIFCO Laboratories社製) を用いて、膜を室温で2時間ブロッキングし、その後、抗ICP4抗体 (希釈率1:500) を用いて、4°Cで一晩インキュベートした。

【0031】A-7 (インビトロでの処理及び組織学的分析)

SK-LMS-1細胞あるいはOST細胞を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c S1c-nu/nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。腫瘍は、ヌードマウス内で直径6から7mm程度に成長した。1×10⁵pfuのd12.CALPを含む50μl (腫瘍容積100mm³あたり) のウィルス懸濁液、あるいは同量のウィルス緩衝液を、30ゲージの針を用いてそれぞれ腫瘍内に注入した。9日後に、全く同じ処理を繰り返した。注入後所定の時間に腫瘍を測定し、式 [0.53×長さ×幅の2乗] を用いて腫瘍容積を計算した。d12.CALPが反対側の腫瘍に到達しうるかを調べる実験では、6週齢の雄のヌードマウスの両側面背部皮下に、SK-LMS-1異種移植片を定着させ、ウィルスを一方の腫瘍内に注入した。

【0032】組織学的研究のため、1×10⁵pfu/腫瘍容積100mm³のd12.CALPを一回投与した後、所定の日数で、腫瘍があるマウスを絶命させた。

皮下腫瘍を取り出し、2%のバラホルムアルデヒド、0.5%のグルタルアルデヒドを用いて、1 mMのMgCl₂を含むPBSで、4°Cで一晩固定した。続いて、X-gal (1 mg/ml)、5 mMのK, Fe (CN)₆、5 mMのK, Fe (CN)₆及び1 mMのMgCl₂をPBS中に含む基質溶液に、該腫瘍を37°Cで3時間浸し、その後、3%のDMSOを含むPBSで洗浄した。

【0033】感染させたウィルスの分布をPCRにより調べるため、感染腫瘍あるいは非感染腫瘍、並びに脳、肺、肝臓、腎臓、心臓、小腸及び子宮あるいは精巣の新鮮な組織から、DNAを調製した。PCR増幅の条件としては、94°Cで40秒間変性させ、60°Cで30秒間アニーリングし、72°Cで90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰り返し行った。ICP6 (リボヌクレオチドリダクターゼ) プライマーとしては、5'-qaca gccatatccgtggc-3' [フォワードプライマー3 (FP3) ; 配列番号9] と5'-actcacagatcggttggcgg-3' [リバースプライマー3 (RP3) ; 配列番号10] を、グリコプロテインEのプライマーとしては、5'-qag atqcgaaatacgaat-3' [フォワードプライマー4 (FP4) ; 配列番号11] と5'-gtgggtggctcgccaaat-3' [リバースプライマー4 (RP4) ; 配列番号12] を、大腸菌のLacZのプライマーとしては、5'-gcgtt acccaacttaatcg-3' [フォワードプライマー5 (FP5) ; 配列番号13] と5'-tgtggcgqgatcaaacc-3' [リバースプライマー5 (RP5) ; 配列番号14] を、グリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase : GAPDH) のプライマーとしては、5'-cccatcaccatcttccagg-3' [フォワードプライマー6 (FP6) ; 配列番号15] と5'-ttgttcataccaggaaatggc-3' [リバースプライマー6 (RP6) ; 配列番号16] を用いて、それぞれ221 bpと320 bp、320 bp、731 bpのDNAを増幅させた (J. Virol. 74, 3832-3841, 2000)。

【0034】A-8 (免疫組織学)

標本をブアン溶液 [15% (v/v) の飽和ピクリン酸溶液、1.65% (v/v) のホルマリン、及び1% (v/v) の酢酸/PBS] で固定し、バラフィンに包埋した。ポリ-L-リジンでコートしたマイクロスライドに、厚さ4 μmの切片をのせ、キシレン中で処理し、段階的アルコールで脱水し、内在のペルオキシダーゼを遮断するため、70%のメタノールとH₂O₂の溶液中に浸した。その後、オートクレーブを121°Cで10分間使用して、10 mMのクエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で抗原を回収した。切片を1% (v/v) のヤギ血清/PBSを用いて、室温で1時間インキュベートし、PBSで洗浄し、マウスカルボニンに対するポリクローナル抗体 (Genes Cells 3, 685-695, 1998) を用いて、2% (w/v) BSA/PBS中で、4°Cで一晩インキュベ

ートした。上記切片を0.005% (v/v) のTween 20/PBSで5回洗浄し、続いて、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG (TAGO Immunologicals社製) を用いて、2% (w/v) BSA/PBSで、室温で1時間インキュベートし、アビジン-ビオチン-セイヨウサビペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories社製) を用いて室温で30分間インキュベートした。0.005% (v/v) のTween 20/PBSで洗浄後、最終反応産物をジアミノベンチジン (WAKO Chemicals) で視覚化し、切片をヘマトキシリンで対比染色した。コントロールとして非特異的染色をみるため、ヤギ血清で処理した組織標本を使用した。

【0035】A-9 (統計的分析)

無対のStudent's t-testを使って、統計的差異を確認した。差異はp < 0.05で、統計的に有意であると考えられた。

【0036】実施例B [結果]

B-1 (ヒトカルボニンプロモーターの発現制御領域の同定)

ヒトカルボニンの発現を制御する最小のプロモーター領域を同定するため、5'部分を欠失した各種カルボニンプロモータールシフェラーゼ構築物をもつプラスミドを、ヒト骨肉腫細胞株MNNG-HOS及びHOS、ならびに、メサンギウム細胞株HMCにトランスクレクトした。メサンギウム細胞株HMCは、平滑筋様表現型に特徴的な成長パターン (山と谷) を安定的に示し、α-平滑筋アクチン及びSM22αといった平滑筋に特異的な遺伝子を発現している。トランスクレクトした3つの細胞株の中でカルボニン遺伝子の発現が最も高かったのは、HMCだった (図1)。以前の報告にもあるように (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998)、カルボニンは、HOS中で中程度の発現を示すが、MNNG-HOSでは全く発現していなかった (図1)。

【0037】プラスミドp-288Lucとp-260LucのHOS及びHMC細胞へのトランジェントトランスクレクションアッセイ (transient transfection assay) の結果、両者のルシフェラーゼの活性がp-1159Lucをトランスクレクションした場合よりも、HOS細胞においては4倍、HMC細胞においては6倍に増大した。これは、カルボニンプロモーター領域の-1159から-288の間に発現抑制領域があることを示している。カルボニンmRNAの発現とプロモーター領域-385から-260の転写活性との間にはかなりの相関関係があった。-260から-219まで、塩基をさらに除去するに従い、HOS細胞とHMC細胞において、共にプロモーター活性が大きく減少した。さらにカルボニン遺伝子プロモーター領域の5'部分の広い範囲が除去された構築物 (p-201Luc, p-176Luc及びp-153Luc) をトランスクレクションした場合は、p-219Lucを用いた場合とルシフェラ

ーゼ活性が同程度であった。これらの結果により、-260から-219の配列は、HOS細胞とHMC細胞の両方におけるカルボニン遺伝子転写の正の発現制御領域であることがわかる。

【0038】上記カルボニン遺伝子プロモーターの-260から-219の領域は、-258のS_{ox} (AACAA T) 及び-250のGATA-1 (CACAAATCAGC) のコンセンサス結合配列に似たいくつかの配列モチーフを含んでいる。p-260Lucからカルボニン遺伝子プロモーターの-260から-239の部分を除去すると、転写活性が50%減少する。S_{ox}及びGATA-1の推定結合部位と-239の下流領域が発現制御機能を示すかを調べるため、プラスミドp-260Lucの-255/-254 (AAからGG)、-246/-244 (-246ではAからG、-244ではCからT)、-232/-231 (CCからTT) の置換をした3つの変異体を作製し、そのプラスミドのトランسفェクトを行った。HMC細胞におけるトランسفェクション実験では、上記3つの変異体は、p-260Luc活性がそれぞれ73±0.2%、76±0.2%、39±0.1%だった。これらの結果により、カルボニンプロモーターの転写活性には、-260から-219までの全体の配列が必要であることがわかった。

【0039】B-2 (ヒト軟部組織腫瘍及び骨腫瘍細胞でのカルボニン遺伝子発現による転写レベルでの調節) ヒト軟部組織腫瘍及び骨腫瘍細胞において、カルボニンの発現とカルボニンプロモーターの転写活性との間の相互作用の存在についてさらに検討するため、カルボニンが発現している、又は発現していない各種のヒト細胞株に、p-260Lucあるいは、p-260Lucの上流にヒト4F2重鎖転写エンハンサー (Mol. Cell Bio 1. 9, 2588-2597, 1989) が挿入された構築物 (p4F2-260Luc) をトランسفェクトした。RT-PCR分析により、カルボニンmRNAの発現が、滑膜肉腫細胞及びSK-LMS-1平滑筋肉腫細胞で認められた。これに対し、OST骨肉腫細胞でのカルボニンの発現は、ごくわずかだった (図2)。図2に示されるように、p-260Luc及びp4F2-260Lucの転写活性は測定したすべての細胞において、カルボニンmRNAの転写物の発現レベルと相関関係があった。これらの実験結果は、ヒト軟部組織腫瘍及び骨腫瘍細胞におけるカルボニン遺伝子の発現が、翻訳開始点の上流260bpの配列により、転写レベルで制御されている可能性を示している。さらに、カルボニンプロモーターの上流に4F2エンハンサーを挿入したところ、カルボニン陽性的滑膜肉腫細胞及びSK-LMS-1細胞において、p-260Lucの転写活性が3倍から5倍に増大した。そのため、以下の実験では、ヒト軟部組織腫瘍及び骨腫瘍細胞におけるHSVのICP4遺伝子の発現の調節には、4F2エンハンサー/-260カルボニンプロモーター配列を使用した。

【0040】B-3 (カルボニン陽性細胞における組換えHSVベクターのインビトロでの選択的複製) カルボニン陽性細胞及び増殖細胞中で選択的に複製するHSVベクターを構築するため、4F2エンハンサー/-260カルボニンプロモーター/ICP4 (pTKΔ-CA LP-ICP4) を含むDNA断片を、ICP4-HSV変異体d120 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) のTK遺伝子座 (U_L23) に挿入して、d12. CALPを作製した。プラスミドpTKΔ-CALP-ICP4は、大腸菌由来のLacZを挿入したICP4タンパク質とβ-ガラクトシダーゼを発現する二つのキメラ導入遺伝子を含んでいる (図3A)。カルボニン発現ヒト細胞株又はカルボニン非発現ヒト細胞株を使用して、d12. CALPのウィルス複製の選択性を評価した (図3B)。

【0041】上記作製した細胞株に、感染多密度0.01のd12. CALP又はhrr3を48時間感染させた。ウィルス複製は、ブラーク形成を指標として評価した (図3C)。カルボニン陽性滑膜肉腫細胞、SK-LMS-1細胞、及びHOS細胞では、d12. CALPはhrr3と同様の細胞変性効果を示した。これに対して、カルボニン陰性のSKN細胞、OST細胞、MNG-HOS細胞、及びHUVVEC細胞では、d12. CALPによる明らかな細胞溶解は認められなかった。もっとも緩慢な増殖速度を示したデスマトイド細胞はSK-LMS-1細胞と同じレベルでカルボニンのmRNAを発現しているが、d12. CALPによる明らかなブラーク形成は認められなかった。以上の結果は、d12. CALPによる細胞変性効果が、カルボニン発現と細胞増殖速度の両方に依存していることを示している。

【0042】図4A及び4B (参考写真1参照) からわかるように、SK-LMS-1細胞及び滑膜肉腫細胞にd12. CALPを低感染多密度 (MOI: 0.001) で感染させた場合、感染の96時間後には、10cmディッシュ中の培養物の完全な腫瘍崩壊が生じる。滑膜肉腫細胞の崩壊が細胞から細胞へと拡大していくことも確認できた (図4A)。感染したSK-LMS-1細胞の中には、溶解前に多核化したものも見られた (図4B、矢印部分)。

【0043】ウィルス力値をシングルステップグロースアッセイで評価した。d12. CALPは、カルボニン陽性SK-LMS-1細胞中で複製したが、d12. CALPの力値は感染の48時間後のカルボニン陰性OST細胞中ではSK-LMS-1細胞に比べて1/10⁶から1/10⁷程度に減少した (図5A)。感染22時間後の細胞抽出物のイムノプロット分析を行った結果、SK-LMS-1細胞ではICP4タンパク質が発現しているが、OST細胞ではICP4タンパク質が発現していないことがわかった。これはウィルス複製分析結果と一致していた (図5B)。これに対し、d12.0ウィルスベクターは、SK-LMS-1及びOSTの培養物において子

孫ウィルスの產生はまったく見られなかった。

【0044】B-4 (組換えHSVベクターによるヒト平滑筋肉腫異種移植片の処理)

治療におけるd12. CALPの効果をインピボで評価するため、SK-LMS-1平滑筋肉腫異種移植片をヌードマウスに定着させ、腫瘍容積100mm³あたり1×10⁷pfuのd12. CALPを二回投与した。対照として、ウィルスバッファーのみを腫瘍部位に投与した。処理前には、腫瘍の容積(それぞれ13.8±2.0と13.9±2.8mm³, n=5)においても、免疫反応性カルボニンの発現レベルにおいても、d12. CALPで処理した腫瘍と対照腫瘍との間には有意な差は見られなかった。d12. CALPの感染は、SK-LMS-1腫瘍の成長抑制とは関連性を示したが、カルボニン陰性OST腫瘍の成長抑制とは関連性がなかった(図6A)。これに対し、SK-LMS-1異種移植片のウィルスバッファーのみでの処理は、処理後89日目までに、進行性腫瘍の成長と全ての動物の死(n=5)が確認でき、進行性腫瘍の成長と動物の死に関連があることがわかった(図6B)。最初のd12. CALP感染から5週間後には、5匹中4匹のマウスにおいて、腫瘍が完全に退縮しているのが確認できた(図7;参考写真2参照)。1匹のマウスでは腫瘍が再成長していた。そこでかかるマウスの再発した腫瘍をd12. CALPで再処理したところ、腫瘍の成長が安定的に抑制された。

【0045】X-galを使った組織化学的染色法では、TK遺伝子座へLacZを挿入することによるβ-ガラクトシダーゼの発現は、d12. CALPで処理したSK-LMS-1腫瘍細胞(図8A及び8B;参考写真3参照)において確認されたが、対照腫瘍細胞では確認することができなかった。これにより、インピボにおいてd12. CALPウイルスが拡散する領域を同定した。8日目には壊死が目立つようになり、この領域においてはLacZの発現が欠乏していた(図8A, 矢印)。倍率を上げると、インピトロの細胞変性分析で観察されたように、青く染色された腫瘍細胞のなかに多核化したものが見られ(図8C及び参考写真3参照、矢印)、それらはSK-LMS-1細胞の典型的な形態学的外見を失っていた。しかし、図8D(参考写真3参照)に示されるように、ウィルス感染マウスにおいて、正常血管を取り巻く平滑筋細胞のLacZ発現は陰性であった。さらに、PCR分析により、d12. CALPを腫瘍内に投与した後8日目に調製した脳、肺、肝臓、腎臓、心臓、小腸又は子宮のDNA中には、d12. CALPに特異的なLacZ配列は確認できなかった。大動脈や胃腸の平滑筋を含む器官において、組織学的にウイルス複製とLacZ発現は生じていなかった。

【0046】B-5 (腫瘍における組換えHSVベクターの拡散)

SK-LMS-1異種移植片に注入され、複製したd1

2. CALPが、血管を経由して離れた場所にある腫瘍細胞を標的とすることができるか否かを評価するため、右脇腹におけるSK-LMS-1異種移植片にd12. CALPを腫瘍内接種し、左脇腹におけるSK-LMS-1異種移植片におけるウィルスの分布を調べたみた。図9A(参考写真4参照)に示されるように、20日目に接種部位と同様に反対側の脇腹で腫瘍細胞においてβ-ガラクトシダーゼの発現が確認できた。組織学的には、右脇腹における腫瘍と左脇腹における腫瘍の双方において、広範囲にわたり腫瘍壊死が見られたが、図9B(参考写真4参照)に示されるように、正常血管を取り巻くカルボニン陽性平滑筋細胞ではd12. CALPによる効果が見られなかった。TK遺伝子座に挿入された、リボヌクレオチドレダクターゼ(ICP6)、糖タンパク質E、又は大腸菌由来のLacZに対するプライマーを用いてPCR法を行うことにより、両脇腹の腫瘍組織ではd12. CALP由来のウィルスDNAが拡散するが、脳や精巣の腫瘍組織には拡散しないことがわかった(図9C:参考写真4参照)。

【0047】B-6 (腫瘍新生血管平滑筋細胞に対する選択的傷害活性)

ヌードマウスの両側背部皮下にヒト平滑筋肉腫細胞を異種移植し、その片側(右側)にd12. CALPを注入したところ、投与後8日目に反対側(左側)の異種移植片に出血がおこり、腫瘍が縮小した(n=4)(図10;参考写真5参照)。この実験で用いた平滑筋肉腫は、d12. CALPが腫瘍細胞自体を傷害しないことインピトロの感染実験で確認しているので、腫瘍の退縮は、対側の腫瘍に血行性に到達したd12. CALPが腫瘍内血管を傷害したものと考えられた。実際、出血後2日の腫瘍を組織学的に検討したところ、腫瘍細胞の広範な出血性壊死の像と血管の破壊像が認められた。また、免疫組織化学により、血管周囲の細胞にLacZとICP4蛋白の発現が認められた。一方、腫瘍と接する正常血管の平滑筋細胞には、細胞傷害を認めなかった。

【0048】

【発明の効果】間葉系細胞由来の悪性腫瘍、すなわち肉腫は、化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返し、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し患者を死に至らしめる。わが国における症例数は、整形外科領域の骨・軟部肉腫を中心に婦人科領域の平滑筋肉腫、消化器外科領域のストローマ腫瘍、胸部・消化器外科領域の悪性中皮腫、脳外科領域の髓椎肉腫、悪性臓膜腫、神経鞘腫等を合わせて年間5000~10000例で、癌腫のおよそ1%と少ないものの、若年者にも多発し有効な治療法がないことより、新治療法の開発を切望する社会的要望が強い。本発明はかかる要望等に応えるものであり、本発明によると、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に発現する、正常細胞に作用しない細胞特異的発現ベクターを提供することができ、かかる細胞特

異的発現ベクターを用いることにより、世界で最初の肉腫細胞選択的な遺伝子治療が可能となり、特にカルボニン遺伝子は消化管ストローマ（G I S T）の31%、平滑筋腫瘍の91%、消化器外科領域のストローマ腫瘍の38%、骨肉腫の60%、平滑筋以外の軟部肉腫の32%に発現しているので、本発明の治療薬は、すべての固*

*形癌に有効な癌治療法として、中でも、腫瘍血管を選択的に破壊する新しい遺伝子治療に有効に用いられる可能性がある。
【0049】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
<120> Cell specific express replication vector
<130> K010P06
<140>
<141>
<160> 16
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 41
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
gaaacaatga cacaatcaqc tcccaataacc aaggccctga c 41
<210> 2
<211> 260
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
gaaacaatga cacaatcaqc tcccaataacc aaggccctga catcacaagg ggagggggaaq 60
gcagctgagg ttgtgggggg aqgtcccccg ccccttggca gccccttaca gccaatggaa 120
cggcccttggaa aqagacccgg gtcgcctccg gacttcaaa aacatgtqaq gaggaaagag 180
tgtgcagacq gaacttcagc cgctgcctct gttctcaqcg tcaagtgccgc cactgcccccc 240
gccaqagccc accggcccaqc 260
<210> 3
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Region consist
of human calponin gene promoter and its structural
gene fragment
<400> 3
gaaacaatga cacaatcaqc tcccaataacc aaggccctga catcacaagg ggagggggaaq 60
gcagctgagg ttgtgggggg aqgtcccccg ccccttggca gccccttaca gccaatggaa 120
cggcccttggaa aqagacccgg gtcgcctccg gacttcaaa aacatgtqaq gaggaaagag 180
tgtgcagacq gaacttcagc cgctgcctct gttctcaqcg tcaagtgccgc cactgcccccc 240
gccaqagccc accggcccaqc atgtcctctg ctcacttcaa ccqaggccct gcttacgggc 300
tgtcaqccqg ggttaagaac aqgttggggg tgg 333
<210> 4
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

27
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:RP3
 <400> 10
 actcacagat cgttgacgac cg

28

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:FP4
 <400> 11
 gagatcgaa tatacgaat
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:RP4
 <400> 12
 gtgggtgggc tcggccaaat

19

20

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:FP5
 <400> 13
 gcgttaccca acttaatcg

19

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:RP5
 <400> 14
 tgtgagcgag taacaacc

18

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:FP6
 <400> 15

cccatcacca tcttccagga

20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: RP6
 <400> 16
 ttgtcatacc agggaaatggc

【画面の簡単な説明】

【図1】カルボニン遺伝子プロモーターの5'欠失変異体をトランスフェクションした場合の転写活性の結果を示す図である。

【図2】カルボニン陽性腫瘍細胞におけるヒトカルボニン発現制御領域の転写レベルでのエンハンサーの効果を示す図である。

【図3】d12. CALPの構造とインピトロでの細胞変性アッセイの結果を示す図である。

【図4】インピトロにおけるd12. CALPによる腫瘍細胞への傷害効果を示す図である。

【図5】インピトロにおいてのカルボニン陽性細胞におけるd12. CALPの選択的傷害活性を示す図である。

*

10* 【図6】インピボにおけるd12. CALPの腫瘍形成抑制効果を示す図である。

【図7】d12. CALP処理したヌードマウスにおける示す図である。

【図8】インピボにおけるd12. CALPの複製を示す図である。

【図9】インピボにおいて、d12. CALPが感染部位から離れた部位に拡散及び複製することを示す図である。

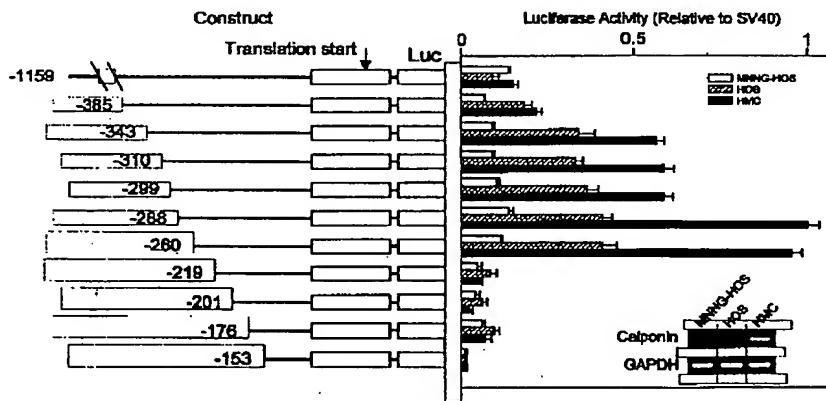
【図10】インピボにおけるd12. CALPの腫瘍新生血管平滑筋細胞に対する選択的傷害活性による腫瘍血管の破裂と腫瘍細胞の出血性壊死による腫瘍の縮小を示す図である。

20

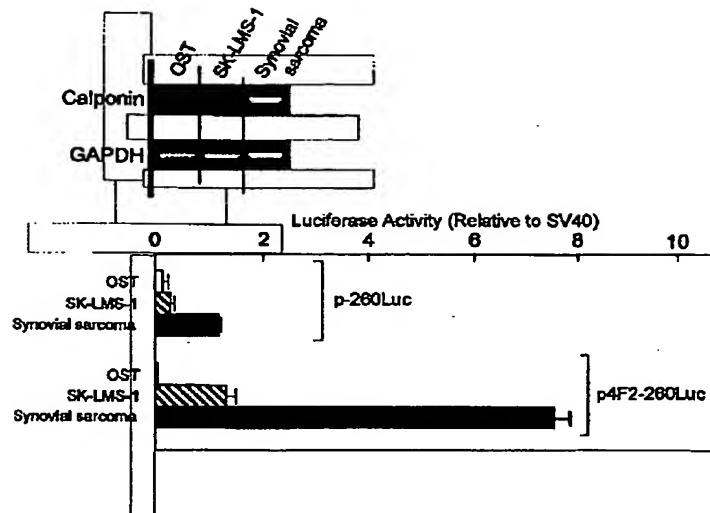
20* 【図1】カルボニン遺伝子プロモーターの5'欠失変異体をトランスフェクションした場合の転写活性の結果を示す図である。

*

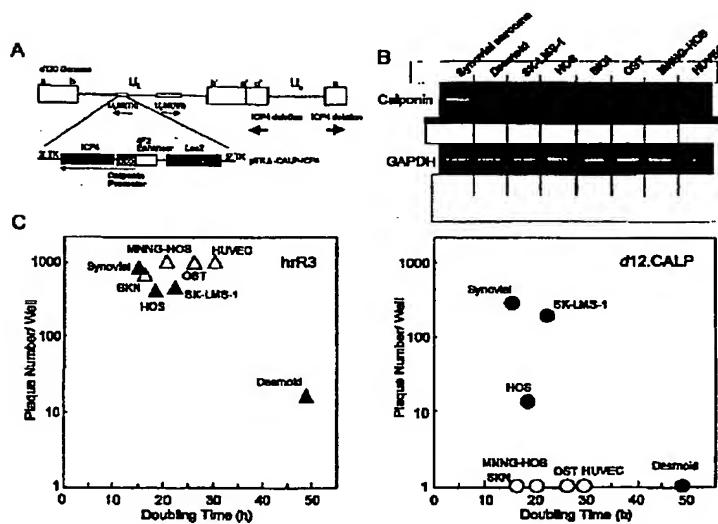
【図1】



【図2】

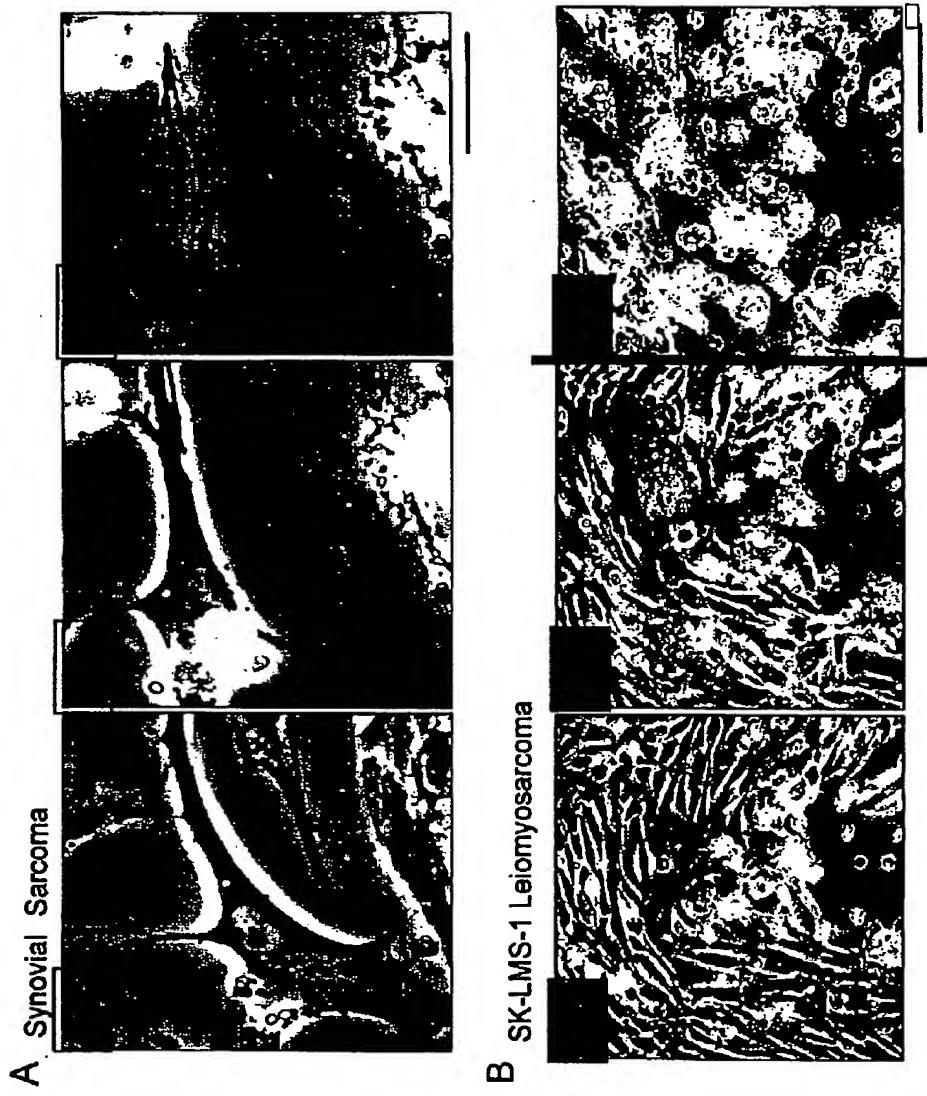


【図3】



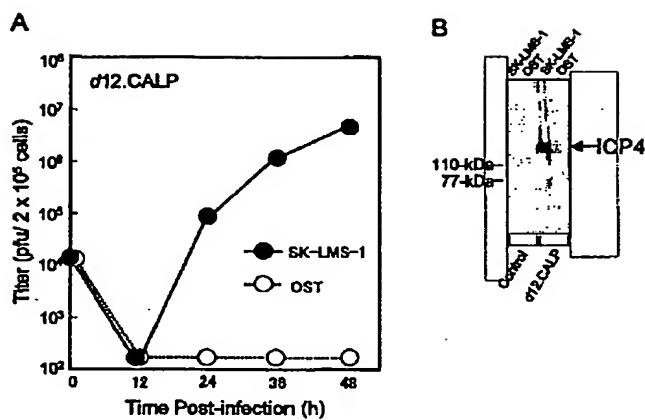
BEST AVAILABLE COPY

[図4]

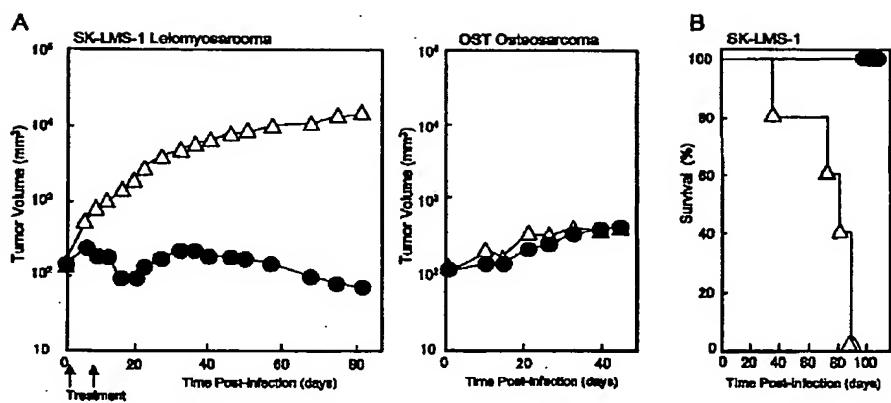


BEST AVAILABLE COPY

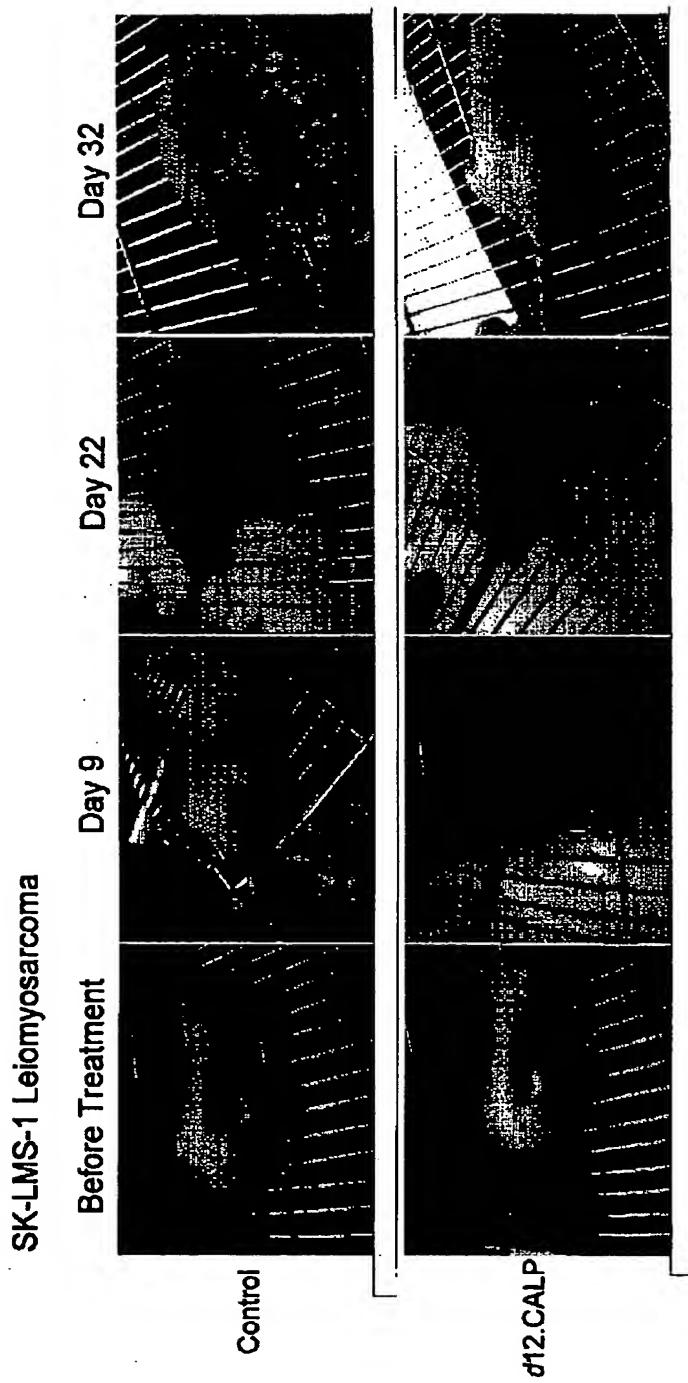
【図5】



【図6】

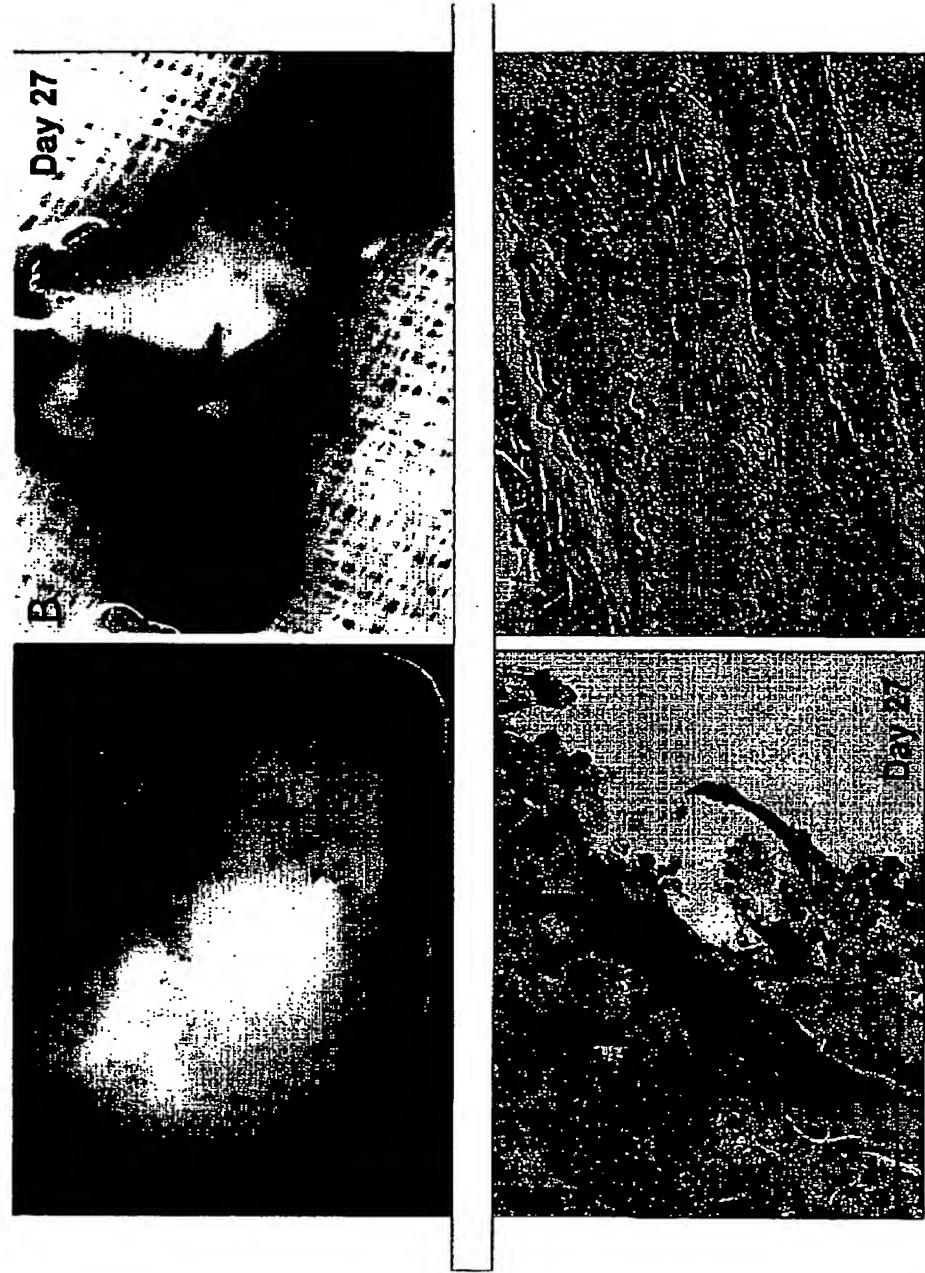


〔図7〕



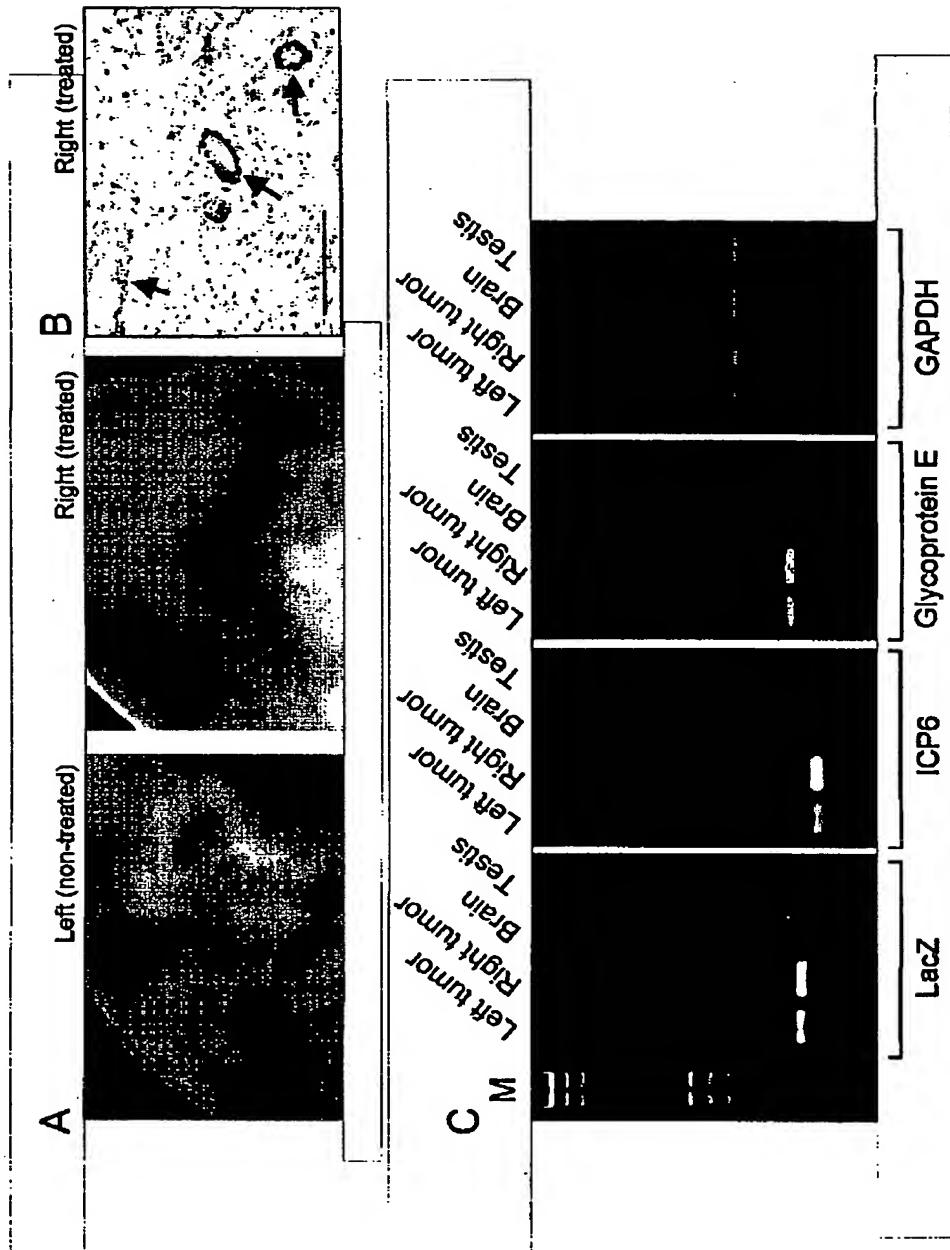
BEST AVAILABLE COPY

[図8]



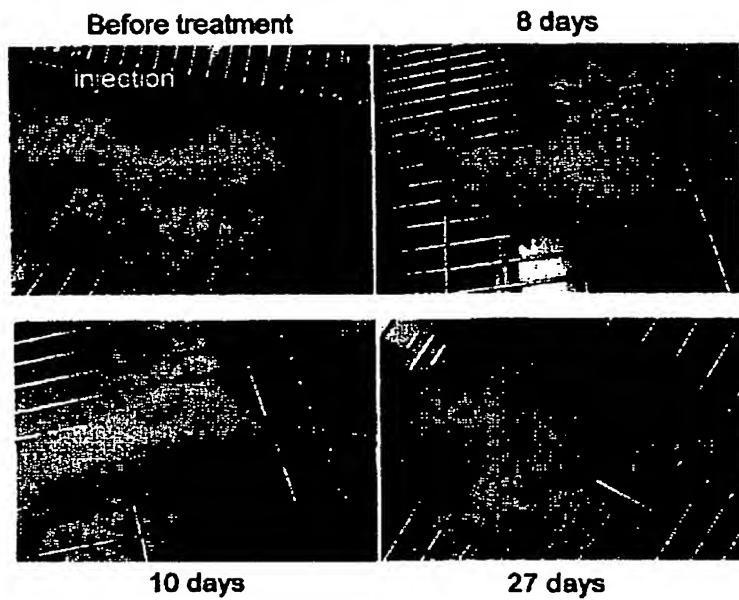
BEST AVAILABLE COPY

[図9]



BEST AVAILABLE COPY

[図10]



フロントページの続き

(72)発明者 山村 優子
奈良県生駒市光陽台151
(72)発明者 宮武 伸一
滋賀県大津市南郷4-38-3

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA02 DA03 EA02
EA04 FA02 FA06 HA17
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
ZB26